

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 17, 1979, pp. 471–481

## Bestimmung von Thyroxin im Serum mit einem heterogenen Enzymimmunoassay: Ergebnisse einer gemeinsamen Erprobung

Von K. Borner

*Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz,*

*J. P. Colombo und C. Bachmann*

*Chemisches Zentrallabor der Universitätskliniken, Inselspital, Bern,*

*R. Haeckel und M. Oellerich*

*Institut für Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover,*

*D. Westerink*

*Diaconessenhuis, Hilversum, afd. Klinisch Chemisch Laboratorium,*

*M. Fischer und P. Wimmer*

*Zentrallaboratorium, Krankenhaus der Stadt Wien-Lainz, Wien,*

*W. Vogt, A. Tausch und M. Knedel*

*Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der Universität München,*

*W. Minder und J. Blum*

*Triemli-Spital, Medizinisches Zentrallabor, Zürich*

in Zusammenarbeit mit

*R. Portenhauser,*

*Fa. Boehringer Mannheim GmbH., Biochemica-Werk Tutzing/Obb.*

(Eingegangen am 23. Oktober 1978/29. Januar 1979)

**Zusammenfassung:** Die vorliegende Arbeit beschreibt die Ergebnisse einer Erprobung eines heterogenen Enzymimmunoassay zur Bestimmung des Gesamt-Thyroxin im Serum durch 7 klinisch-chemische Laboratorien. Der Test arbeitet nach dem Prinzip des Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und verwendet Peroxidase als Indikator-Enzym.

Die Überprüfung der analytischen Zuverlässigkeit ergab im Meßbereich zwischen 39 und 322 nmol/l folgende Ergebnisse:

1. Präzision in Serie von 3,1 bis 10,4% bei Einfachanalysen (Variationskoeffizient).
2. Präzision von Tag zu Tag von 3,7 bis 20,4% bei Einfachanalysen (Variationskoeffizient).
3. Präzision zwischen den Laboratorien 5,4 bis 6,8%.
4. Wiederfindung von Reinsubstanz nach Zusatz zu Serum 93 bis 120% der Einwaage.

5. Im wesentlichen eine Übereinstimmung mit Sollwerten von RIA-Kontrollseren.
6. Im Methodenvergleich mit dem analogen Radioimmunoassay (RIA) desselben Herstellers geringfügig höhere Ergebnisse bei 288 klinischen Proben.
7. Im Methodenvergleich mit anderen Radioimmunoassays und anderen Methoden (Competitive Protein Binding Assay, Bestimmung von Hormoniod) teils übereinstimmende, teils höhere Ergebnisse.
8. Im Methodenvergleich mit dem homogenen Enzymimmunoassay (EMIT) übereinstimmende Ergebnisse.
9. Keine Interferenzen bei Hyperlipämie und Hämolyse.
10. Eine noch ungeklärte Interferenz bei Hyperbilirubinämie.

In Bezug auf die Praktikabilität unterscheidet sich der ELISA-Test von dem sehr ähnlich aufgebauten Radioimmunoassay mit solid phase technique durch das Fehlen radioaktiver Substanzen und durch eine längere Haltbarkeit der Reagenzien. Der Zeitaufwand zur Durchführung des Enzymimmunoassay ist bei manueller Technik geringfügig größer als für den analogen Radioimmunoassay.

*Determination of thyroxine ( $T_4$ ) in serum with a heterologous enzyme immunoassay: Results of an evaluation by seven laboratories*

**Summary:** This paper describes the evaluation of a heterologous enzyme immunoassay for the determination of total thyroxine in serum by a group of seven clinical chemical laboratories. The test follows the principles of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and uses peroxidase as a marker.

The evaluation of analytical reliability yielded the following results within the analytical range from 39 unto 322 nmol/l:

1. Within-batch precision ranged from 3.1 unto 10.4% (coefficient of variation) with single analyses.
2. Between-batch precision ranged from 3.7 unto 20.4% with single analyses.
3. Between-laboratories precision ranged from 5.4 unto 6.8%.
4. Pure thyroxine, added to serum or thyroxine-free serum, gave recoveries between 93 and 120%.
5. Analysis of control sera gave results essentially comparable to the assigned values based upon radioimmunoassays.
6. Analysis of 288 clinical sera gave slightly higher results by the enzyme immunoassay than by the analogous radioimmunoassay from the same manufacturer.
7. Comparison with other methods of analysis (radioimmunoassays, competitive protein ligand assays, hormonal iodine assay) yielded partly comparable, partly higher results.
8. Comparison with the homogenous enzyme immunoassay (EMIT) led to comparable results.
9. Interference due to hyperlipemia or hemolysis was not observed.
10. There might be an interference in hyperbilirubinaemic sera, due to an as yet unknown factor.

With respect to practicability the ELISA-test compares favourably with the analogous solid phase radioimmunoassay. The main differences are the absence of radioactive material and a longer shelf-life of reagents. Following the manual procedure the time taken to perform the enzyme immunoassay is slightly longer than for the analogous radioimmunoassay.

## Einleitung

Die Bestimmung des Gesamt-Thyroxins ( $T_4$ )<sup>2</sup> im Serum dürfte der z.Zt. am meisten durchgeführte in vitro-Test zur Überprüfung der Schilddrüsenfunktion sein (1–3). Zu diesem Zweck werden derzeit überwiegend radioimmunologische Methoden eingesetzt, deren Hauptnachteil im dabei notwendigen Umgang mit radioaktiven Stoffen liegt. Im Enzymimmunoassay (Übersichten bei 4–8) wird der radioaktive marker durch ein Enzym ersetzt, jedoch die spezifische und nachweisempfindliche Antigen-Antikörper-Reaktion beibehalten. Zur Bestimmung von Thyroxin sind je ein homogener (9,10) und ein heterogener Enzymimmunoassay (11,12) veröffentlicht worden.<sup>1</sup> Während über den homogenen Enzymimmunoassay bereits erste Erfahrungsberichte durch externe Erprober vorliegen (14–16), ist dies für den heterogenen Enzymimmunoassay bisher noch nicht

der Fall. Letzteres Ziel setzt sich die vorliegende Arbeit. Sie berichtet die Ergebnisse einer Erprobung des heterogenen Enzymimmunoassay durch eine Gruppe von Laboratorien auf Einladung durch den Hersteller des Tests vor der Freigabe für den Markt. Art und Umfang der Erprobung waren vom Hersteller vorgegeben, der auch die Testreagenzien stellte. Darüber hinaus haben

1) Nach Einreichen des Manuskripts wurde uns ein weiterer heterogener Enzymimmunoassay von Thyroxin bekannt (13).

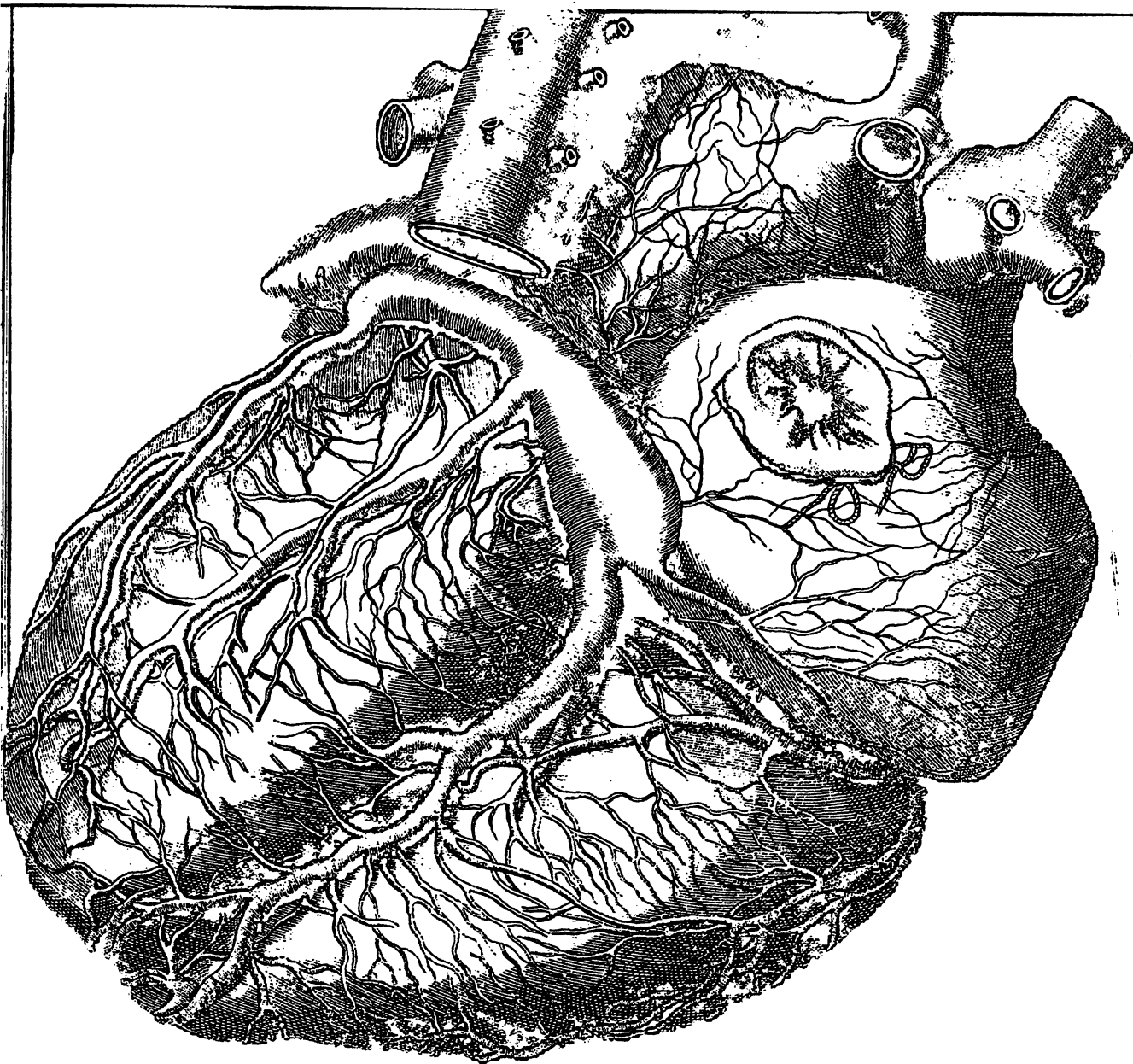
2) Im Text benutzte Abkürzungen:

CPBA	competitive protein binding assay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay, heterogener Enzymimmunoassay
EMIT	enzyme multiplied immunoassay technique <sup>R</sup> , homogener Enzymimmunoassay
RIA	Radioimmunoassay
$T_4$	L-Thyroxin

Routinesichere Herzinfarkt-Diagnostik mit Merckotest®

CK (NAC)

CK-MB (NAC)



Die Creatinkinase (CK) ist ein Schlüsselenzym des Muskelstoffwechsels.

Die Bestimmung des Anteils der Aktivität ihres Isoenzyms CK-MB („Herzmuskeltyp“) ermöglicht echte differentialdiagnostische Fortschritte in der Herzinfarkt-Diagnostik.

Bitte fordern Sie ausführliche Unterlagen an.

E. Merck • Frankfurter Straße 250 • D-6100 Darmstadt 1

Diagnostica MERCK

**W. Schwemmler**

## **Mechanismen der Zellevolution**

Grundriß einer modernen Zelltheorie

Format 17 cm x 24 cm. 276 Seiten. 120 Abbildungen und 30 Tabellen (davon 6 in Farbe). 1 Klapptafel. Umfangreiches Glossar. Ausführliches Literaturverzeichnis. 1978. Plastik flexibel DM 42,- ISBN 311 0067765

Der Autor stellt den Grundriß einer modernen Zelltheorie vor. Dabei versucht er, den Gesamtkomplex Evolution in seiner kosmischen, chemischen, biologischen und ansatzweise kulturellen Dimension dem naturwissenschaftlich interessierten Leser verständlich zu machen. Zu diesem Zweck werden alle verfügbaren experimentellen und theoretischen Daten herangezogen. Sie werden, wenn auch nicht quantitativ, so doch in ihrer qualitativen Aussage voll ausgeschöpft.

Die Darstellung der Daten selbst erfolgt nicht durch bloßes Aneinanderreihen, sondern durch Herausstellen elementarer Zusammenhänge. Dies findet in der Aufstellung verständlicher Systeme und Modelle sichtbarsten Ausdruck. Die Evolutionsphänomene werden folglich nicht nur beschrieben und erklärt, sondern auch systematisiert und in ein allgemeines Evolutionskonzept eingeordnet. Das wesentliche Ergebnis ist die Ableitung der Periodizität evolvierender Systeme wie unter anderem ein hypothetisches „Periodensystem der Zellen“.

Das Buch trägt also nicht nur dem Bedürfnis nach einschlägiger Information über den Prozeß der Zellevolution Rechnung, sondern vermittelt gleichzeitig ein neues komplexes Evolutionsverständnis. Letzteres entspricht dem zentralen Bestreben der Wissenschaft, zu immer wirklichkeitsgetreueren, einheitlichen Modellvorstellungen der gesamten realen Welt zu gelangen. So gesehen ist die Abhandlung auch ein bescheidener Beitrag zur übergreifenden Modellbiologie bzw. Theoretischen Biologie. Angesichts anschwellender Datenfluten bestehen hierzu in steigendem Maße Bedürfnis und Notwendigkeit.

Preisänderungen vorbehalten

einzelne Teilnehmer zusätzliche Prüfungen vorgenommen.

### Prinzip der Thyroxin-Bestimmung

Der von G. Kleinhammer et al. (11,12) beschriebene Test lehnt sich eng an das analoge Verfahren des Radioimmunoassay mit sog. solidphase technique in Antikörper-beschichteten Röhrchen an. Der Test verwendet Peroxidase als Indikator und umfaßt folgende Teilschritte:

1. Trennung des Thyroxins von den Trägerproteinen des Serums durch Inkubation mit 8-Anilino-1-naphthalin-sulfonsäure (ANS) in Barbiturat-Puffer. Konkurrierende Bindung von Thyroxin und Thyroxin-Peroxidase-Konjugat an den wandständigen Antikörper des Reaktionsgefäßes.
2. Abtrennung von ungebundenem Thyroxin und Thyroxin-Konjugat durch Absaugen des Inkubationsgemisches und Waschen der Reaktionsgefäße.
3. Inkubation des antikörpergebundenen Thyroxin-Enzym-Konjugates mit Puffer und Substrat (Indikatorreaktion).
4. Bestimmung der Enzymaktivität durch photometrische Messung der Absorption des Puffersubstratgemisches nach 50 bis 70 Minuten.

Die Eigenschaften des verwendeten Antikörpers sind nach Angaben des Entwicklers in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 2 enthält die Konzentrationen der Testreagenzien im Ansatz.

### Teilnehmer, Geräte, Material und Methoden

Die Teilnehmer werden in den Ergebnissen durch Buchstaben A bis I entsprechend Tabelle 3 gekennzeichnet. (Die zusätzlich aufgeführten Laboratorien H und I sind firmeninterne Arbeitsgruppen, die sich nur an dem nachstehend beschriebenen Ringversuch beteiligten). Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die eingesetzten Dosier- und Meßgeräte.

Die klinischen Untersuchungsproben (Human-Seren) stammen aus den Routinelaboratorien der jeweiligen Erprober.

Jeder Teilnehmer war gehalten, sich möglichst eng an die Arbeitsvorschrift und das Erprobungsprotokoll des Herstellers

Tab. 1. Eigenschaften des Thyroxin-Antikörpers nach Angaben des Herstellers.

Immunogen:	Thyroxin-Rinderserumalbumin
Tierspezies:	Kaninchen
Affinität:	$K_A = 2,5 \cdot 10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$
Spezifität:	
L-Thyroxin	1,00
D-Thyroxin	0,82
L-Triiodthyronin	0,007*
D-Triiodthyronin	0,015
Tetraiodthyroessigsäure	0,58
3,5-Diiodtyrosin	< 0,000045
3-Monoiodtyrosin	< 0,000045

\* Durch Kontrollmessungen von Labor C bestätigt.

Tab. 2. Konzentrationen der Testreagenzien im Ansatz

1. Bindungsreaktion	
Natrium-Barbituratpuffer, pH = 8,6	120 mmol/l
Natrium-Phosphatpuffer	17,8 mmol/l
Rinderserumalbumin	2,0 g/l
8-Anilino-1-naphthalin-sulfonsäure	1,27 mmol/l
Thyroxin-Peroxidase-Konjugat	ca. 12 U/l = 6 µg/l

#### 2. Standards

Thyroxin, zugesetzt zu T<sub>4</sub>-freiem Humanserum, 0 bis 322 nmol/l.

#### 3. Indikatorreaktion

Natrium-Phosphat-Citratpuffer, pH = 5,0	100 mmol/l
Natrium-Perborat	1,47 mmol/l
ABTS*	14 mmol/l

\* 2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulfonsäure (6)]-diammoniumsalz

Tab. 3. Verwendete Geräte

Teilnehmer, Ort	Pipettiersystem	Photometer*
A Wien	Capilleter (Labora)	LKB 7400/402 und 619 nm
B Zürich	Kolbenpipette (Eppendorf)	Zeiss PM4/420 nm
C Berlin	Elektronischer Dilutor (Brand)	Eppendorf, digital, 6115
D Hannover	Dilutor (Eppendorf)	Eppendorf, digital, 5090
E München	Dilutor (Micromedic)	Eppendorf, digital, 6115
F Bern	Dilutor (Micromedic)	Zeiss PM4/420 nm
G Hilversum	Capilleter (Labora)	Vitatron MPS
H Tutzing 1	Kolbenpipette (Eppendorf)	Eppendorf, digital, 6115
I Tutzing 2	Clinipette (Labora)	Eppendorf, digital, 6115

\* Sofern keine andere Wellenlänge angegeben ist, wurde bei 405 nm gemessen.

zu halten. Die Reagenzien für den Enzymimmunoassay (Enzymun-Test<sup>R</sup> T<sub>4</sub>), einige Kontrollproben und Reagenzien für den analogen Radioimmunoassay mit identischem Antikörper wurden vom Hersteller (Boehringer Mannheim GmbH.) geliefert.

Sofern zusätzliche radioimmunologische Untersuchungen durch Dritte erfolgten, sind diese in der Danksagung erwähnt.

### Statistische Methoden

1. Vorzeichentest nach Dixon & Mood (17)
2. Bivariate Regressionsanalyse (18)
3. Sonstige Standardmethoden (17)

### Ergebnisse

#### Meßbereich und Bezugskurve

Abbildung 1 zeigt eine typische Bezugskurve eines Labors ohne Koordinatentransformation. Ein Reagenzienleerwert von etwa A = 0,600 ist hierbei subtrahiert. Die Signale sind auch bei manueller Technik gut meßbar und stabil. Bei manueller Technik, wie sie von allen Teilnehmern angewendet wurde, sind die Rahmenbedingungen der Indikatorreaktion, Temperatur und Zeit, von Serie zu Serie variabel. Es muß daher in jeder Serie eine neue Bezugskurve erstellt werden. Abbildung 1

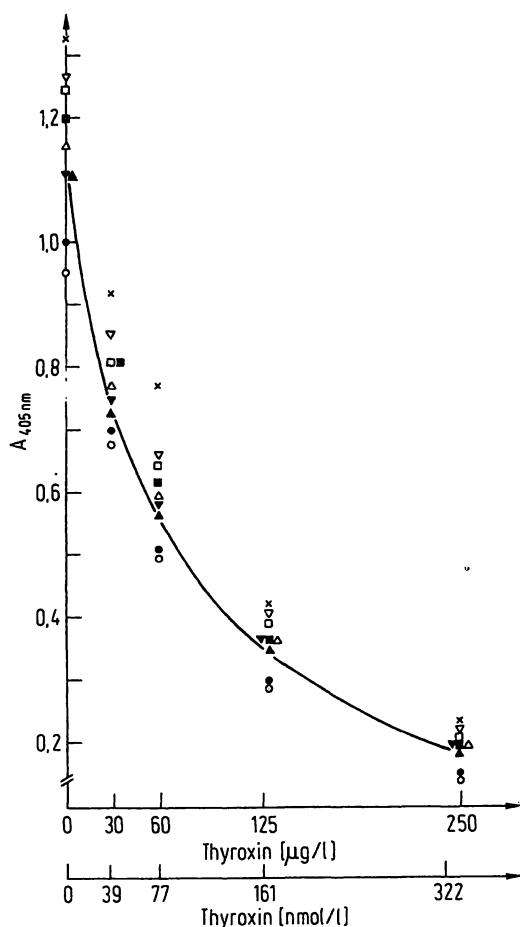


Abb. 1. Beispiel für eine Bezugskurve.

Die Einzelpunkte repräsentieren jeweils das Mittel einer Dreifachbestimmung. Die Bezugskurven wurden an 9 verschiedenen Arbeitstagen ermittelt. Die Messung erfolgte unter Subtraktion eines Reagenzienleerwertes von etwa  $A = 0,600$ . Die ausgezogene Kurve ist ein individuelles Beispiel vom 5. Arbeitstag (Labor C). (Wegen der variablen Inkubationszeiten wurde auf das Bilden eines Mittelwertes verzichtet).

zeigt, in welchem Bereich die Meßsignale bei 9 aufeinanderfolgenden Serien in einem Labor schwankten. Durch Verbinden identischer Symbole können die einzelnen Bezugskurven dargestellt werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur eine Kurve zusammenhängend eingezeichnet.

Der Meßbereich beträgt 39 bis 322 nmol/l. Eine Erweiterung nach unten dürfte ohne Änderung des Reaktionsansatzes möglich sein.

### Präzision

Zur Ermittlung der Präzision stellte sich jeder Teilnehmer je ein Sammelserum im unteren, mittleren und oberen Konzentrationsbereich her. Die  $T_4$ -Konzentrationen wurden anschließend in 5 aufeinanderfolgenden Serien bestimmt. In jeder Einzelserie wurden für jede Probe 5 Analysen in zufallsverteilter Reihenfolge durchgeführt.

Abbildung 2 zeigt die bei diesen Versuchen bestimmte mittlere Präzision in Serie in Abhängigkeit von der Konzentration. Bei Dreifachanalysen beträgt die Präzi-

sion in Serie (VK) minimal 2,3 und maximal 7,4%. Führt man nur Einfachanalysen aus, so reicht die Präzision in Serie von 3,1 bis 10,4%.

Die Präzision von Tag zu Tag (Abb. 3) zeigt ebenfalls eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration und

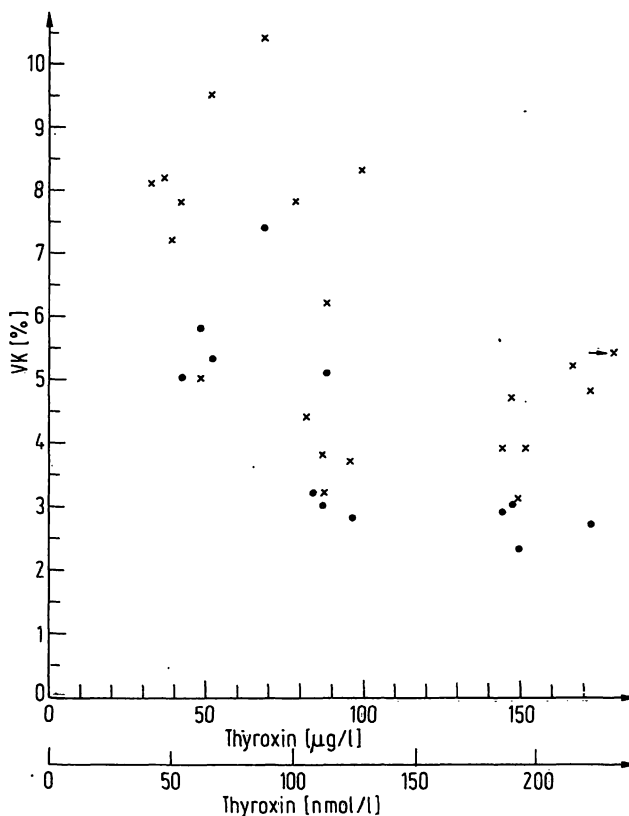


Abb. 2. Mittlere Präzision in Serie

Punkte: Dreifachanalysen (Labor C, D, E, F)  
Kreuze: Einfachanalysen (Labor A bis F)

Jeder Punkt bzw. jedes Kreuz zeigt die an 5 Tagen im Durchschnitt erzielte Präzision in Serie in Abhängigkeit von der gemessenen Konzentration des Sammelserums.

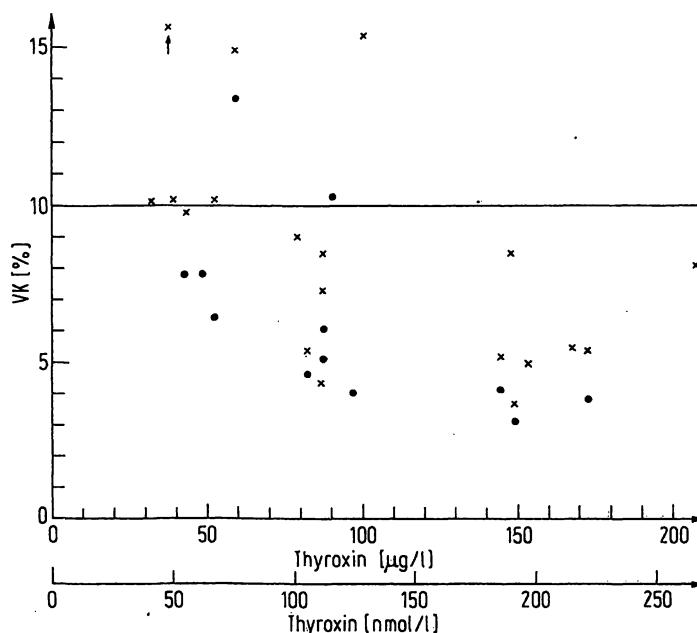


Abb. 3. Präzision von Tag zu Tag

Punkte: Dreifachanalysen (Labor C, D, E, F)  
Kreuze: Einfachanalysen (Labor A bis F)

ist im oberen Meßbereich am günstigsten. Bei Durchführung von Dreifachanalysen beträgt die Präzision von Tag zu Tag (Variationskoeffizient) minimal 3,1 und maximal 13,4% der gemessenen Konzentration. Die bei 4 Teilnehmern aus Doppelanalysen errechnete Präzision von Tag zu Tag ist nur geringfügig schlechter als die Präzision bei Dreifachanalysen (auf die Wiedergabe der Berechnungen wurde verzichtet).

In einem Ringversuch wurde mit zwei Proben die Präzision zwischen den Laboratorien ermittelt. Sie betrug 5,4 bzw. 6,8% (Tab. 4).

### Richtigkeit

Die Überprüfung der Richtigkeit der Methode machte insofern Schwierigkeiten, als es unseres Wissens keine anerkannte Referenz-Methode für die Bestimmung von Thyroxin gibt. Aus diesem Grunde wurde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ausführlich geprüft:

1. Von einzelnen Teilnehmern zusätzlich durchgeführte Messungen an käuflichen Kontroll-Seren ergaben die in Tabelle 5 aufgeführten Ergebnisse. Als Vergleichs-(Soll)wert wurde hierbei der Median aller angegebenen methodenabhängigen Sollwerte gewählt.
2. Teilnehmer C und D führten Zusatzversuche mit Reinsubstanz zu T<sub>4</sub>-freiem bzw. nativem Serum durch und fanden dabei zwischen 93 und 120% der Einwaage wieder (Tab. 6).

Tab. 4. Ergebnisse eines Ringversuchs aller 9 Teilnehmer. Es wurden zwei Proben unbekannten Inhalts an 5 Tagen untersucht (Dreifachanalysen). Aus den Mittelwerten der einzelnen Laboratorien wurde die Streuung zwischen den Laboratorien errechnet.

Probe	Konzentration ( $\bar{x}$ ) [nmol/l]	Streuung zwischen den Laboratorien (VK) [%]
A	45,4	5,4
B	168,2	6,8

Tab. 5. Untersuchung von Kontrollseren.

Material	Sollwert <sup>1</sup> [nmol/l]	Istwert, $\bar{x}$ [nmol/l]	Zahl der Werte, n	$\Delta \bar{x}$ [%]	Labor
Precinorm U 710	76	80	3	+ 5	I
Boehringer-M. <sup>2</sup> 6	84	93	29	+ 11	C
Q-PAK/Hyland	96	117	3	+ 21	I
Lederle I	107	136	3	+ 27	I
Lederle I	107	124	32	+ 16	C
Lederle I	107	118	11	+ 11	D
Precinorm U 609	114	98	3	- 15	I
Precinorm U 608	116	99	3	- 15	I
Lederle II	243	226	3	- 7	I
Lederle II	243	254	27	+ 4	C
Lederle II	243	257	11	+ 6	D

<sup>1</sup> Als Sollwert wurde der Median der von den Herstellern angegebenen Sollwerte gewählt.

<sup>2</sup> Kontrollserum aus der Fertigpackung

Tab. 6. Wiederfindung von L-Thyroxin.

Es wurden Dreifachanalysen pro Bestimmung durchgeführt.

Material	T <sub>4</sub> , zuge- setzt <sup>+++</sup> [nmol/l]	T <sub>4</sub> , gefun- den [nmol/l]	Wiederfindung [%]	Labor
T <sub>4</sub> -freies Serum (+)	0	0	-	C
"	38,4	45,9	119,8	C
"	76,6	87,9	114,8	C
"	153,1	142,0	92,7	C
"	306,3	285,7	93,3	C
Serum (++)	64,4	64,4	100,0	D (27)
"	128,7	132,6	103,0	D
"	193,0	186,6	96,7	D
"	257,4	245,8	95,5	D

(+) Aus einem Sammelserum wurde Thyroxin durch Adsorption an Aktivkohle entfernt. Eine anschließende Überprüfung der Serumproteine ergab normale Elektrophorese-Fractionen und eine normale Gesamtprotein-Konzentration.

(++) Die in Parallelansätzen bestimmte T<sub>4</sub>-Konzentration wurde subtrahiert.

(+++ L-Thyroxin, puriss., Reinheitsgrad 0,99, Fa. Henning-Berlin

### Methodenvergleich

#### Methodenvergleich mit einem Radioimmunoassay mit identischem Antikörper

5 Teilnehmer (B, C, E, F, G) untersuchten insgesamt 288 äußerlich unauffällige Patientenserum gleichzeitig mit dem Enzymimmunoassay und dem analogen Radioimmunoassay desselben Herstellers. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 und Tabelle 7 zusammengefaßt. Der Enzymimmunoassay liefert im Mittelwert etwas höhere Ergebnisse als der Radioimmunoassay ( $p < 0,01$ ). Die Gleichung der bivariaten Regressionsgeraden lautet:

$$C_{ELISA} = 1,150 \times C_{RIA} - 21,8 (\mu\text{g/l}) \text{ bzw. } -28,1 (\text{nmol/l})$$

#### Methodenvergleich mit anderen Radioimmunoassays

Eine Reihe von Teilnehmern verglichen die Ergebnisse des Enzymimmunoassays mit den Ergebnissen, die mit anderen Radioimmunoassays ermittelt wurden. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

#### Methodenvergleich mit dem competitive protein binding assay (CPBA)

Der CPBA lieferte bei einem Teilnehmer deutlich niedrigere Ergebnisse als der Enzymimmunoassay (Abb. 5).

#### Methodenvergleich mit der Bestimmung des Hormoniods

Ein Teilnehmer verglich die Ergebnisse des Enzymimmunoassay mit der chemischen Bestimmung des Hormoniods nach Ionenaustauscher-Chromatographie. Die Iodbestimmung lieferte im Mittelwert etwas niedrigere Ergebnisse (Abb. 6).

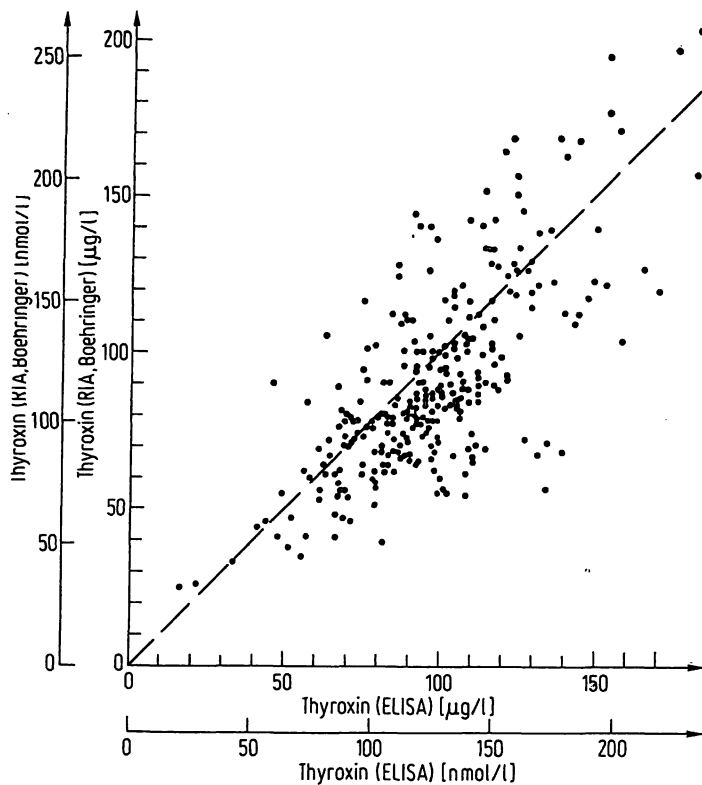


Abb. 4. Methodenvergleich Radioimmunoassay (Boehringer) mit dem Enzymimmunoassay (Boehringer).

Ergebnisse der Teilnehmer B, C, E, F, G.  $N = 288$ . Statistische Auswertung vgl. Tab. 7. Gestrichelte Linie: Winkelhalbierende.

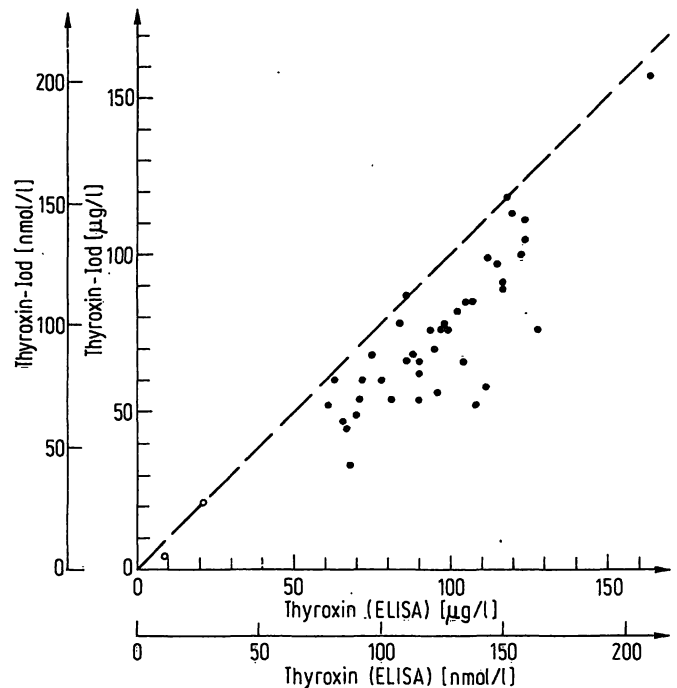


Abb. 6. Methodenvergleich der chemischen Hormon-Iodbestimmung (28-30) mit dem Enzymimmunoassay.

$N = 52$ ,  $\bar{C}_{ELISA} = 119,3 \text{ nmol/l}$ ,  $\bar{C}_{Iodbest.} = 92,9 \text{ nmol/l}$ ;  $p < 0,01$ ;  $r = 0,883$

Gleichung der bivariaten Regressionsgeraden:

$C_{Iodbest.} = 0,970 \times C_{ELISA} - 22,8 \text{ (nmol/l)}$

Gestrichelte Linie: Winkelhalbierende (Labor G)

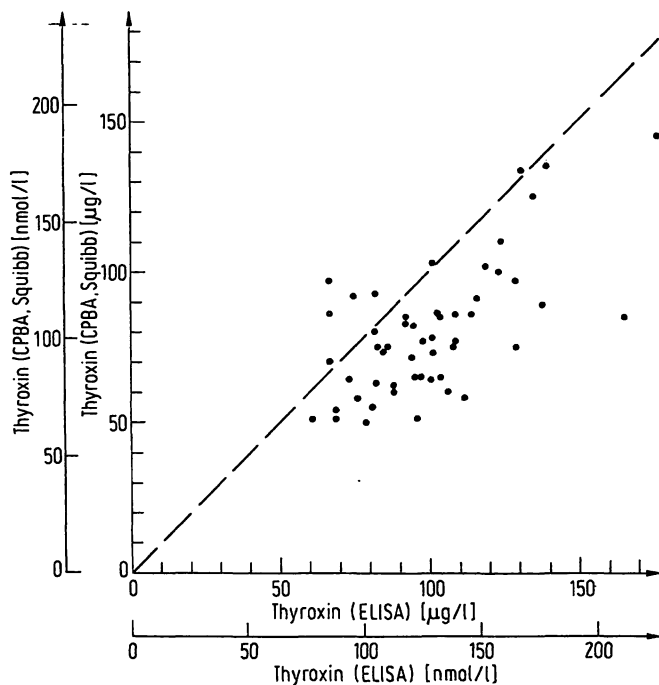


Abb. 5. Methodenvergleich Competitive Protein Binding Assay (CPBA) mit dem Enzymimmunoassay.

$N = 52$ ,  $\bar{C}_{ELISA} = 128,9 \text{ nmol/l}$ ,  $\bar{C}_{CPBA} = 103,3 \text{ nmol/l}$ ,  $p < 0,01$ .

Gleichung der bivariaten Regressionsgeraden:  $C_{CPBA} = 0,891 \times C_{ELISA} - 11,5 \text{ (nmol/l)}$

$r = 0,654$

Gestrichelte Linie: Winkelhalbierende

(Die ELISA-Werte basieren auf Dreifachanalysen, die CPBA-Werte auf Einfachanalysen (Labor C).

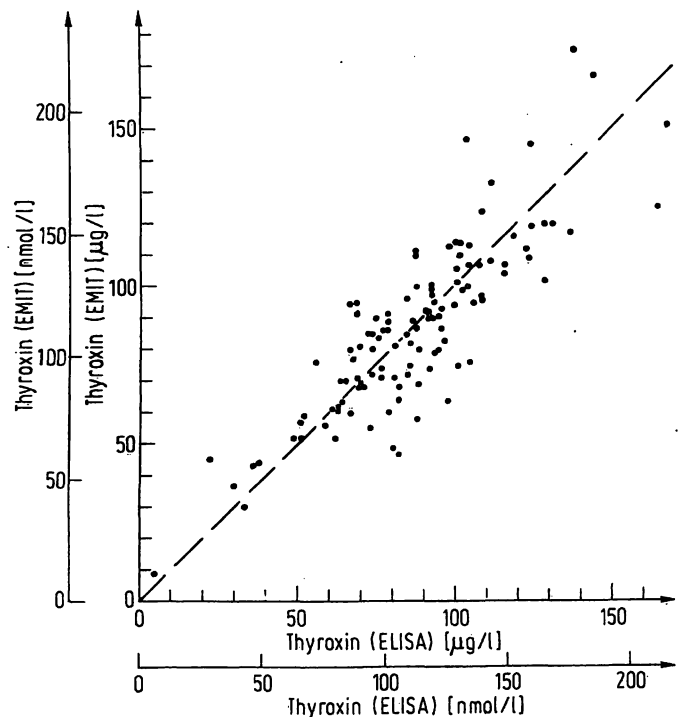


Abb. 7. Methodenvergleich homogener Enzymimmunoassay (EMIT) und heterogener Enzymimmunoassay (ELISA)

$N = 119$ ,  $\bar{C}_{ELISA} = 113,8 \text{ nmol/l}$ ,  $\bar{C}_{EMIT} = 113,1 \text{ nmol/l}$  kein signifikanter Unterschied

$r = 0,870$

Gleichung der bivariaten Regressionsgeraden:

$C_{EMIT} = 1,041 \times C_{ELISA} - 5,4 \text{ (nmol/l)}$



Tab. 7. Methodenvergleich T<sub>4</sub>-RIA (Boehringer Mannheim) mit T<sub>4</sub>-ELISA.  
(x = T<sub>4</sub> ELISA y = T<sub>4</sub> ELISA y = T<sub>4</sub>-RIA), Seren mit normaler Bilirubinkonzentration.

Labor	Werte- paare	Steigung und Achsen- abschnitt der biva- rianten Regressions- geraden		Mittelwert T <sub>4</sub> -ELISA	Mittelwert T <sub>4</sub> -RIA	Vorzeichentest der Paardifferenzen		Korrelationskoeffizient
	n	a	b [nmol/l]	c [nmol/l]	c [nmol/l]	p	Bewertung	r
B	57	1,131	– 31	128	114	< 0,01	signifikant	0,588
C	60	1,135	– 24	130	123	> 0,05	nicht signifikant	0,848
E	59	0,882	– 9	130	105	< 0,01	signifikant	0,875
F	58	1,176	– 32	116	104	0,01	nicht signifikant	0,852
G	54	1,193	– 12	125	138	< 0,01	signifikant	0,853
B bis G	288	1,150	– 28	126	116	< 0,01	signifikant	0,749

#### Methodenvergleich mit dem homogenen Enzymimmunoassay (EMIT-Syva)

Der homogene Enzymimmunoassay ergab bei 2 Teilnehmern im Mittelwert übereinstimmende Ergebnisse (Abb. 7).

#### Interferenzen

##### Natrium-Azid

Das Indikator-Enzym Peroxidase wird durch Azidionen gehemmt. Mit Natriumazid konserviertes Kontrollmaterial ist für den Test ungeeignet (19).

##### Hyperbilirubinämie

4 Teilnehmer untersuchten je 30 Patientenseren mit erhöhter Bilirubin-Konzentration sowohl mit dem heterogenen Enzymimmunoassay als auch mit dem analogen Radioimmunoassay. Alle Teilnehmer fanden mit dem Enzymimmunoassay signifikant höhere Ergebnisse als mit dem gleichartigen Radioimmunoassay (Tab. 9). Ein weiterer Teilnehmer bestätigte dieses Ergebnis mit einem anderen Radioimmunoassay. Es besteht der Eindruck, daß die Abweichung von den RIA-Ergebnissen ausgeprägter bei Seren mit Hyperbilirubinämie ist als bei Seren mit Normobilirubinämie (Tab. 7). Die Erhöhung ist nicht abhängig von der Bilirubinkonzentration. (Eine diesbezügliche Auswertung der Ergebnisse des Teilnehmers C wird hier nicht wiedergegeben). Ein *in vitro* Zusatzversuch von unkonjugiertem Bilirubin durch Teilnehmer D ergab keine Interferenz bis zu einer Bilirubinkonzentration von 100 µmol/l. Eine Überprüfung von sonstigen Laborergebnissen der untersuchten Seren ergab in 14 Fällen je 12 mal ein erniedrigtes Gesamtprotein, 9 mal eine erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie in 4 von 6 Fällen eine erniedrigte Cholinesterase-Aktivität (Teilnehmer C).

##### Hämolyse

Zusatzversuche mit Hämolysat ergaben bis zu 10 g/l Hämoglobin keine Störung des Enzymimmunoassay (Labor F).

#### Hyperlipämie

Bei der Untersuchung von 59 ausgewählten Seren mit deutlicher Trübung und erhöhten Triglycerid-Konzentrationen traten keine besonderen meßtechnischen Probleme oder Teststörungen auf.

#### Diskussion

Der vorliegende Bericht faßt die Ergebnisse einer Gruppe von Untersuchern zusammen, die in Bezug auf die Zusammensetzung ihres Patientengutes, die Laborgeräteausrüstung und die praktische Erfahrung mit dem heterogenen Enzymimmunoassay ein breites Spektrum darstellten. Ziel der gemeinsamen Untersuchung war es, die analytische Zuverlässigkeit und die Praktikabilität des von G. Kleinhammer et al. (11, 12) entwickelten heterogenen Enzymimmunoassay durch unabhängige Erprober zu überprüfen. Die in der Hauptsache bis Ende März 1978 abgeschlossenen Versuche waren mit einer einheitlichen Produktionscharge des Enzymun-Test<sup>R</sup> Thyroxin durchgeführt, die noch nicht für den allgemeinen Gebrauch bestimmt war. Der Test ist nach Auskunft des Herstellers identisch mit dem inzwischen im Handel befindlichen Test. Nur der Meßbereich wurde etwas nach unten erweitert.

#### Zuverlässigkeit

##### Meßbereich

Der Meßbereich von 39 bis 322 nmol/l Thyroxin genügt den meisten klinischen Ansprüchen (Abb. 1). Bei 414 klinischen Untersuchungsproben fand sich nur eine mit einer Thyroxinkonzentration über dem Meßbereich. Konzentrationen unter dem untersten Kalibrierwert waren etwas häufiger (17 = 4,1%). Eine entsprechende Anpassung des untersten Kalibrierpunktes ist inzwischen erfolgt. Aufgrund der vom Entwickler vorgelegten Daten zur Bestimmung von Triiodthyronin (11) erscheint eine 10 bis 50 fach

Tab. 8. Methodenvergleich T<sub>4</sub>-ELISA (Boehringer Mannheim) mit anderen Radioimmunoassays

Labor	Radioimmunoassay	Wertepaare	Steigung u. Achsenabschnitt der bivariaten Regressions- geraden	Mittelwert T <sub>4</sub> -ELISA $\bar{c}$ [nmol/l]	Mittelwert T <sub>4</sub> -RIA $\bar{c}$ [nmol/l]	Vorzeichentest d. Paardifferenzen p Signifikanz	Korrelations- koeffizient r
B, E	RIA-Amersham- Buchler	117	1,109	- 25,9	127,1	< 0,01+	0,875
D	RIA-Medizinische Hochschule Hannover	60	0,977	1,7	98,6	> 0,05-	0,945
F	RIA-Clinical Assays	60	0,870	- 9,3	119,8	< 0,01+	0,814
G	RIA-Byk- Mallinckrodt	35	0,554	+ 15,2	120,1	< 0,01+	0,860
A, G	RIA-SPAC (Byk-M.)	107	1,117	- 14,9	105,3	0,01-	0,902

Tab. 9. Methodenvergleich T<sub>4</sub>-ELISA mit T<sub>4</sub>-RIA (Boehringer Mannheim) bei Hyperbilirubinämie

Labor	N	$\bar{c}_{ELISA}$ [nmol/l]	$\bar{c}_{RIA}$ [nmol/l]	$\Delta \bar{c}$ %	Vorzeichen-Test Bewertung p
C	29	105,8	82,4	+ 28	< 0,01 signifikant
E	30	118,2	80,7	+ 46	< 0,01 signifikant
F	30	103,4	71,2	+ 45	< 0,01 signifikant
G	30	154,0	128,3	+ 20	< 0,01 signifikant
C, E, F, G	119	120,5	90,7	+ 32,8	< 0,01 signifikant
D*	30	112,0	80,9	+ 38,3	< 0,01 signifikant
C, D, E, F, G	149	118,8	88,7	33,9	< 0,01 signifikant

\*D verwendete einen selbstentwickelten RIA

niedrigere Nachweisgrenze für Thyroxin bei anderen Problemstellungen technisch erreichbar.

### Präzision

Die Präzision in Serie (Abb. 2) und von Tag zu Tag (Abb. 3), ausgedrückt als Variationskoeffizient, zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration in der Probe, ebenso wie die Präzision zwischen den Laboratorien (Tab. 4). Die beiden erstgenannten Größen liegen in der Größenordnung für Radioimmunoassays: In einer 1977 (20) veröffentlichten Übersicht über kommerzielle Radioimmunoassays werden 39 Fertigtests zur Bestimmung von Gesamt-Thyroxin aufgeführt. Die Extremwerte für die Präzision in Serie (VK) werden mit 1 bis 9,3% angegeben, für die Präzision von Tag zu Tag mit 3,4 bis 22% (vgl. auch l.c. 21).

Die Erprober des Tests glauben einen merklichen „Lerneffekt“ bei sich beobachtet zu haben, d.h. präzisere Ergebnisse bei zunehmender Erfahrung. Wie weit damit die von Labor zur Labor variierende Präzision erklärt wird, bleibt offen.

Eine Verbesserung der Präzision im hypothyreoten Bereich ist sicher wünschenswert. Nach allgemeiner Übereinstimmung der Erprober sollten klinische Proben als Doppelansätze und Standards als Dreifach-Ansätze bestimmt werden. Es bleibt abzuwarten, ob mit zunehmender Erfahrung auch Einfachansätze annehmbar werden.

### Richtigkeit

Beim Fehlen einer anerkannten Referenzmethode fällt es schwer, die Richtigkeit immunologischer Thyroxinbestimmungen zu beurteilen. Immerhin liegen die an Kontrollseren gewonnenen Ergebnisse im Bereich der Mediane der methodenabhängigen Sollwerte, wobei letztere erhebliche Unterschiede untereinander aufweisen (Tab. 5). Auch die Ergebnisse von Wiederfindungsversuchen liegen innerhalb der Fehlerbreite der Methode (Tab. 6).

### Vergleichbarkeit

Durch umfangreiche Methodenvergleiche sollte geklärt werden, wieweit konkurrierende Methoden vergleichbare Ergebnisse mit klinischem Untersuchungsmaterial liefern. Dabei wurde zum Teil auch auf Methoden zurückgegriffen, denen ein andersartiges analytisches Prinzip zugrunde liegt. Eine weitergehende Evaluierung dieser Methoden war dabei nicht beabsichtigt.

Die Bewertung der Ergebnisse wird erschwert durch die bei immunologischen Testen übliche schlechte Präzision im Vergleich zu einfachen klinisch-chemischen Analysen. Bei aus mehreren Laboratorien zusammengelegten Ergebnissen ergeben sich zusätzlich teilweise merklich schlechtere Korrelationen als für die einzelnen Laboratorien. Ähnliche ungünstige Ergebnisse zeigen

Ringversuche für die radioimmunologische Bestimmung von Thyroxin und Triiodthyronin (22,23). Der Vergleich mit dem analogen Radioimmunoassay, mit solid phase technique und identischem Antikörper – jedoch anders markiertem Antigen und anderer Nachweisreaktion – ergibt im Durchschnitt nur geringfügig höhere Ergebnisse mit dem Enzymimmunoassay (Tab. 7 und Abb. 4). Die beträchtlichen Unterschiede einzelner Wertepaare sind auffallend, jedoch im Schrifttum keine Ausnahme (vgl. l.c. 24).

Der Vergleich des heterogenen Enzymimmunoassay mit Radioimmunoassays anderer Herkunft ergibt in zwei Fällen gut übereinstimmende Ergebnisse, in 3 weiteren Fällen signifikant höhere Ergebnisse (Tab. 8). Wie weit es sich um echte methodisch bedingte Unterschiede handelt, wird sich erst bei größerer Erfahrung mit dem Test herausstellen.

Der Competitive Protein Binding Assay (CPBA) unterscheidet sich stärker von den vorgenannten Radioimmunoassays durch Verwenden eines natürlichen Bindungspartners und durch eine vorhergehende Extraktion. Zusätzliche systematische Fehler können durch unvollständige Extraktion bzw. unzutreffende Korrektur der Extraktion und durch hohe Konzentration freier Fettsäuren entstehen (25,26). Möglicherweise erklären sich so die in einem kleinen Kollektiv beobachteten niedrigeren CPBA-Ergebnisse im Vergleich zum Enzymimmunoassay (Abb. 5).

Die chemische Bestimmung des Hormon-Iods unterscheidet sich sehr weitgehend von den immunologischen Methoden. Ihre Spezifität ist u.a. wesentlich geringer. Ein Vergleich des Enzymimmunoassay mit dieser nach einem anderen Prinzip arbeitenden Methode ergab immerhin ein gewisses Maß an proportionaler Übereinstimmung (Abb. 6). (Die unerwartet niedrigen Ergebnisse der chemischen Iod-Bestimmung beruhen vermutlich auf einem systematischen Fehler in der Kalibrierung der Methode). Der homogene Enzymimmunoassay (EMIT) unterscheidet sich in der Zusammensetzung seiner Reagenzien stark vom hier geprüften heterologen Enzymimmunoassay (ELISA). Umso mehr beeindruckt die gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Tests bei 2 Erprobern (Abb. 7).

### Interferenzen

Die Störung der Indikatorreaktion durch Natriumazid läßt sich leicht durch Auswahl geeigneter Kontrollseren vermeiden. Mit Störungen der Indikatorreaktion durch Trübung und Hämolyse ist nach den vorläufigen Ergebnissen und infolge der vorhergehenden Phasentrennung auch aus theoretischer Sicht kaum zu rechnen. Eine postprandiale Hyperlipämie sollte man jedoch zunächst vermeiden, um nicht eine potentielle Beeinflussung der Bindungsreaktion durch freie Fettsäuren hervorzurufen. Die leicht höheren Ergebnisse bei Hyperbilirubinämie werden nach dem Eindruck der Erprober beim hetero-

logenen Enzymimmunoassay nicht durch Bilirubin selbst hervorgerufen. Vermutlich geht die Hyperbilirubinämie häufig mit einer die Störung hervorrufenden Ursache einher, deren Identifikation noch aussteht, zum Beispiel einer Hypoproteinämie oder einer erhöhten Konzentration von Gallensäuren. Durch weitere Versuche wird zu klären sein, ob bei Seren mit ungewöhnlich hoher Proteinkonzentration bzw. abnormer Bindung für Thyroxin ein zusätzlicher Extraktionsschritt einzuschalten ist. Ein derartiges Vorgehen wird auch für den Radioimmunoassay empfohlen (1).

#### Praktikabilität aus der Sicht des Anwenders

Alle Reagenzien, Kalibrierlösungen und ein Kontrollserum zur Richtigkeitskontrolle werden komplett als Fertigpackung geliefert und sind nach Angaben des Herstellers bei Lagerung im Kühlschrank (2 bis 8°C) ca. 1 Jahr haltbar. Die Haltbarkeit der geschlossenen Fertigpackung ist damit wesentlich länger als diejenige von Radioimmunoassays auf der Basis von Markierungen mit  $^{125}\text{I}$ . Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Lösungen ist allerdings sehr viel kürzer, z.T. in der Größenordnung einer Woche. Hier ist besonders die geringe Stabilität des Indikatorenzyms zu beachten.

Der am stärksten auffallende Vorteil des Tests ist das Vermeiden von radioaktiven Substanzen. Die für den Umgang mit radioaktiven Substanzen einschließlich der Abfallbeseitigung erforderlichen Vorkehrungen und Einrichtungen werden somit nicht benötigt.

Als wesentliche Geräte werden ein Kühlschrank (noch besser ein Tiefkühlschrank) und ein Photometer guter Qualität mit Digitalanzeige und Drucker benötigt. Die Verwendung eines Pipettier-Automaten ist empfehlenswert, desgleichen eine Möglichkeit der rechnerunterstützten Auswertung der nichtlinearen Bezugskurve. Während für den homogenen Enzymimmunoassay mehrere Möglichkeiten der Vollmechanisierung realisiert sind (vgl. l.c. (5)), ist zur Zeit kein vollmechanisches Analysensystem für das ELISA-Prinzip auf dem Markt. Die Ergebnisse diesbezüglicher Entwicklungsarbeiten sind abzuwarten.

Das pro Analyse benötigte Probenvolumen ist mit 20 Mikroliter gering. Bei manueller Technik muß in jeder Serie eine neue Standardkurve erstellt werden. Der Zeitaufwand (Abb. 8) und damit der Personalaufwand ist für den heterogenen Enzymimmunoassay bei manueller Technik bzw. mäßiger Teilmechanisierung etwas geringer als für den konkurrierenden homogenen Enzymimmunoassay, jedoch — infolge des Aufwandes für die Indikatorreaktion — etwas größer als für den gleichartigen Radioimmunoassay. Mit der Rationalisierung auch von Teilschritten dürfte der Zeitaufwand noch zu vermindern sein.

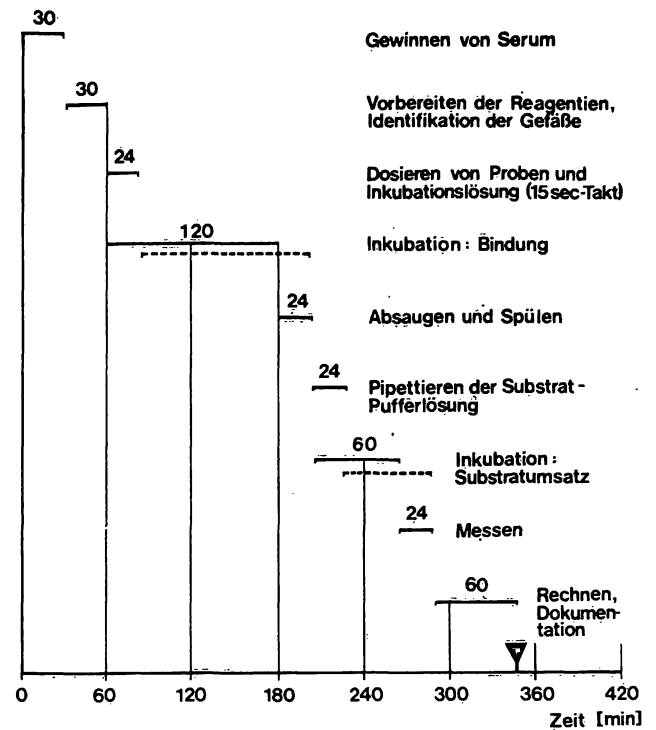


Abb. 8. Zeitdiagramm für die Analyse von 39 klinischen Proben mit ELISA-Technik.

Gesamtzahl der Analysen = 96 (= eine Packung)  
 39 klinische Proben = 78 (Doppelanalysen)  
 5 Standards = 15 (Dreifachanalysen)  
 1 Kontrollserum = 3 (Dreifachanalyse)  
 ausgezogene Linie: erster Vorgang einer Serie  
 gestrichelte Linie: letzter Vorgang einer Serie

#### Schlußfolgerung

Die Bestimmung von Thyroxin im Serum mit dem heterogenen Enzymimmunoassay nach dem ELISA-Prinzip erfüllt die derzeit üblichen Zuverlässigkeitskriterien und ist ausreichend praktikabel. Der Test ist nach Auffassung der Erprober eine gleichwertige Alternative zu den derzeit üblichen radioimmunologischen Bestimmungsmethoden für Thyroxin.

#### Danksagungen

Wir danken für die Durchführung von radioimmunologischen Vergleichsuntersuchungen:

Herrn Prof. Dr. Oeff, Nuklearmedizinische Abteilung, Klinikum Steglitz der FU Berlin,  
 Herrn Dr. P. A. Verduin und Herrn Dr. A. W. Pennings, Diaconessenhuis, Hilversum,  
 Herrn Dr. I. Benes, Nuklearmedizinisches Labor, Triemli-Spital, Zürich.

Weiterhin möchten die Verfasser allen Mitarbeitern für die sorgfältige Durchführung der Versuche danken.

## Literatur

1. Krüskemper, H. L., Rudorff, K. H. & Herrmann, J. (1977), *Dtsch. Med. Wochenschr.* 102, 526–529.
2. Pfannenstiel, P. (1978), *Dtsch. Ärztebl.* 75, 1853–1858.
3. Stepanas, A. V., Mashiter, G. & Maissey, M. N. (1976), *Eur. J. Nucl. Med.* 1, 161–165.
4. Wisdom, B. (1976), *Clin. Chem.* 22, 1243–1255.
5. Haeckel, R. & Oellerich, M. (1977), *Lab. Med.* 1, 121–131.
6. Schuurs, A. H. W. M. & van Weemen, B. K. (1977), *Clin. Chim. Acta* 81, 1–40.
7. Vogt, W. (1978) (Hrsg.): *Enzymimmunoassay*. Thieme Verlag, Stuttgart.
8. Voller, A., Bartlett, A. & Bidwell, D. E. (1978), *J. Clin. Pathol.* 31, 507–520.
9. Ullman, E. F., Blakemore, J., Leute, R. K., Einstadt, W. & Jaklitsch, A. (1975), *Clin. Chem.* 21, 1011.
10. Jaklitsch, A. P., Schneider, R. S., Johannes, R. J., Levine, J. E. & Rosenberg, G. L. (1976), *Clin. Chem.* 22, 1185.
11. Kleinhammer, G., Lenz, H., Linke, R. & Staehler, F. (1978): Enzymimmunologische Bestimmung von T4 und T3 in anti-körperbeschichteten Röhrchen. In: *Enzymimmunoassay*. (Vogt, W. Hrsg.) Stuttgart S. 42–51.
12. Kleinhammer, G., Lenz, H., Linke, R. & Staehler, F. (1977), *Clin. Chem.* 23, 1123.
13. Schall, R. F., Fraser, A. S., Hansen, H. W., Kern, C. W. & Tenoso, H. J. (1978), *Clin. Chem.* 24, 1801–1804.
14. Galen, R. S. & Forman, D. (1977), *Clin. Chem.* 23, 119–121.
15. McReynolds, C. W., Schoder, S. M. & Schneider, R. S. (1977), *Clin. Chem.* 23, 1123.
16. Van Lente, F. & Fink, D. J. (1978), *Clin. Chem.* 24, 387–388.
17. Sachs, L. (1974), *Angewandte Statistik*. Springer-Verlag, Berlin. 4. Aufl.
18. Averdunk, R. & Borner, K. (1970), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 8, 263–268.
19. Borner, K. & Rietbrock, N. (1978), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16, 335–342.
20. Hopkins, J. A. C., Edwards, L., Herner, A. E. & Van Dreal, P. (1977), *Clin. Chem.* 23, 403–406.
21. Broughton, A. (1978), *Clin. Chem.* 24, 1221–1280.
22. Horn, K., Marschner, I. & Scriba, P. C. (1976), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14, 353–360.
23. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. Protokolle der Ringversuche.
24. Leute, R. K. & Orth, H. D. (1978): Prinzip und Anwendung des homogenen Enzymimmunoassay (EMIT). In: *I.c.* (7) S. 18–19.
25. Shaw, W., Hubert, I. L., Powell, M. K. & Spierto, F. W. (1976), *Clin. Chem.* 22, 1181.
26. Alexander, N. M. & Nishimoto, M. (1978), *Clin. Chem.* 24, 751–753.
27. Oellerich, M., Haindl, H. & Haeckel, R. (1979), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 483–488.
28. Pilleggi, V. J. & Kessler, G. (1968), *Clin. Chem.* 14, 339–347.
29. Backer, E. T., Posthmes, Th. J. & Wiener, J. D. (1967), *Clin. Chim. Acta* 15, 77–85.
30. Kreutzer, E. K. J. (1971), *Dissertation*, Wolters-Noordhoff NV. Groningen.

Prof. Dr. K. Borner  
Inst. f. Klin. Chemie  
u. Klin. Biochemie  
Klinikum Steglitz  
Freie Universität Berlin  
Hindenburgdamm 30  
D-1000 Berlin 45

